

**Vergleichende Untersuchungen
über die Inaktivierung
verschiedener Virusarten
durch Gammastrahlen**

HEIDI STETTMUND VON BRODOROTTI

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548315_0014

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H. Mahnel

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE INAKTIVIERUNG
VERSCHIEDENER VIRUSARTEN DURCH GAMMASTRAHLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Heidi Stettmund von Brodorotti
aus
München
München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Tag der Promotion: 28. Juli 1978



Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	9
2. SCHRIFTTUM	10
2.1 Gammastrahlen, Begriffsbestimmung	10
2.2 Wirkung von Gammastrahlen auf Mikroorganismen	11
2.3 Wirkung von Gammastrahlen auf Viren	12
2.3.1 Grundlagen des Wirkungsmechanismus	12
2.3.2 Direkte Wirkung	14
2.3.3 Indirekte Wirkung	15
2.3.4 Inaktivierungskinetik	17
2.3.5 Wirkung auf Vermehrungsfähigkeit und Strukturbestandteile eines Virus	18
2.4 Inaktivierung von Pocken-, Pseudowut-, Newcastle Disease- und Reo-Viren	20
2.4.1 Pocken-Viren	20
2.4.2 Pseudowut-Virus	23
2.4.3 Newcastle Disease-Virus	25
2.4.4 Reo-Viren	26
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1 Material und Methoden	27
3.1.1 Virusarten	27
3.1.2 Nachweisverfahren	32
3.1.3 Virustitrierungen	33
3.1.4 Restvirusnachweis	34
3.1.5 Strahlungsquelle	36
3.1.6 Versuchsanordnung	37

	Seite
3.2 Versuche und Ergebnisse	39
3.2.1 Strahleninaktivierung beim Hühnerpocken-Virus	39
3.2.2 Strahleninaktivierung beim Newcastle-Disease-Virus	40
3.2.3 Strahleninaktivierung beim Reo-Virus	42
3.2.4 Strahleninaktivierung beim Pseudowut-Virus	43
3.2.5 Unterschiede in der Resistenz von Hühnerpocken-, Pseudowut-, Newcastle Disease- und Reo-Viren	50
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	52
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	59

1. Einleitung

Die Anwendung von Gammastrahlen gewinnt im Bereich der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Bedeutung. Der Schwerpunkt verlagert sich immer mehr in Richtung ihrer inaktivierenden bzw. keimabtötenden Wirkung.

Gammastrahlen bieten gegenüber anderen keimabtötenden Maßnahmen viele Vorteile. Sie inaktivieren selbst bei niedrigen Temperaturen zuverlässig alle Keime, so daß auch thermolabile Präparate sterilisiert werden können. Sie ermöglichen den Gebrauch von hitzeempfindlichem Verpackungsmaterial. Die Strahlen durchdringen luft- und wasserdichte Behältnisse. Weiterhin besteht die Möglichkeit, automatische geschlossene Produktionslinien an den Bestrahlungsanlagen einzurichten (83,95). Auf dem Gebiet der Virusinaktivierung ist es von großem Vorteil, daß antigene und immunogene Komponenten gegenüber der ionisierenden Strahlung resistenter sind als die Vermehrungsfähigkeit. Denn bei Viren wird primär die Nukleinsäure angegriffen (24,35,36,39, 68). Diese "schonende" Virusinaktivierung ist besonders für die Herstellung von Vakzinen interessant, da bei den üblichen Verfahren vielfach auch Antigenität und Immunogenität in Mitleidenchaft gezogen werden (101).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Kinetik der Inaktivierung von hochtitrigen Virussuspensionen mittels Gammastrahlen an Beispielen darzustellen. Der Erfassung von Restvirus wurde dabei besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Für die Versuche wurden vier verschiedene Virusarten ausgewählt, die für die Impfstoffherstellung aktuell sind.

2. Schrifttum

2.1 Gammastrahlen, Begriffsbestimmung

Gammastrahlen sind energiereiche (100 keV $\rightarrow$ 10 MeV) elektromagnetische Strahlen, die von radioaktiven Substanzen und bei Atomkernreaktionen ausgesendet werden. Sie besitzen die Eigenschaft, Atome der Materie zu ionisieren.

Durch die Strahlung werden aus den Elektronenhüllen der Atome Elektronen herausgeschleudert und Elektronenpaare gebildet. Ein Elektronenpaar besteht aus dem befreiten Elektron (negatives Ion) und dem positiv geladenen Restatom (positives Ion).

Neben der Ionisierung kommt es auch zu einer Anregung der Atome. Elektronen werden hier aus den Elektronenhüllen nicht herausgeschleudert, sondern nur auf eine höhere Bahn gehoben. Das Atom besitzt nun mehr Energie als in seinem Grundzustand, sucht aber durch Abgabe der aufgenommenen Energie, seinen Grundzustand wieder zu erlangen. Die angeregten Atome sind deshalb chemisch besonders aktiv.

Die Dosiseinheit für ionisierende Strahlung wird mit "rad" (radiation absorbed dose) bezeichnet. Ihr liegt diejenige Strahlungsmenge zugrunde, die im durchstrahlten Medium eine Energieabsorption von 100 erg pro Gramm bedingt (78). Zwar gilt seit 1. Januar 1978 die Bezeichnung "Joule/kg", aber in dieser Arbeit wird noch "rad" verwendet, um den Vergleich mit den Literaturangaben zu erleichtern.

2.2 Wirkung von Gammastrahlen auf Mikroorganismen

Gammastrahlen sind in der Lage, Mikroorganismen zu inaktivieren, sie abzutöten oder bei ihnen Mutationen hervorzurufen (19,60,70, 88, 95). Bei Viren weiß man, daß die Nukleinsäuren den Hauptangriffspunkt darstellen. Auch bei höher organisierten Mikroorganismen und Pilzen scheinen die Nukleinsäuren bezüglich der Inaktivierung die gleiche dominierende Rolle zu spielen. Die Strahlenempfindlichkeit wächst prinzipiell mit steigender Differenzierung eines Organismus. Ganz allgemein kann man sagen, daß Viren gegenüber Strahlen die größte Widerstandsfähigkeit aufweisen. Es folgen die Bakterien und schließlich die Pilze. Abweichungen kommen jedoch vor. Für die zuverlässige Abtötung der Sporen von *Cl. botulinum* beispielsweise sind Strahlendosen von $4.5 - 5 \times 10^6$ r erforderlich (20).

2.3 Wirkung von Gammastrahlen auf Viren

2.3.1 Grundlagen des Wirkungsmechanismus

Erste Informationen über die Anwendung von ionisierenden Strahlen auf Viren stammen aus dem Jahre 1904 (37). Aber erst 1947 hat L e a (57) in seinem Buch "Action of Radiations on Living Cells" die Grundlagen für die Strahlenforschung niedergelegt. Diese beruhten auf dem Prinzip der "Target"-Theorie. Allerdings glaubte er, daß die Gammastrahlen auf das gesamte Viruspartikel einwirken. 1953 bewies E p s t e i n (24) den Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit und der Nukleinsäure. Einen großen Fortschritt bedeutete die Einstufung der verschiedenen Organismen in vier Gruppen entsprechend ihrer Strahlenempfindlichkeit durch T e r z i (92). Diese Daten wurden später von K a p l a n und M o s e s noch korrigiert (51). T e r z i meinte, daß DNS- und RNS-Viren mit einsträngiger Nukleinsäure gegenüber Strahlen am wenigsten empfindlich seien. An zweiter Stelle platzierte er die DNS-Viren mit doppelsträngiger Nukleinsäure. Die Vertreter der dritten Gruppe waren die Bakterien und haploiden Hefepilze. Zellen mit doppeltem Chromosomensatz, die schon durch geringe Strahlendosen inaktiviert werden, ordnete er an die letzte Stelle ein. Damals waren die RNS-Viren mit doppelsträngiger Nukleinsäure noch unbekannt. L e v i n s o n und R u b i n (61) stellten jedoch fest, daß DNS- und RNS-Viren mit einsträngiger Nukleinsäure 10 mal empfindlicher gegenüber Bestrahlung waren als Viren mit einer doppelsträngigen NS. Diese höhere Resistenz der doppelsträngigen Viren wurde auch von anderen Wissenschaftlern bestätigt (19, 35, 62).

Diskutiert wurde folgendes:

- a) Nur Doppelbrüche in der NS sind letal (26, 35, 79).
- b) Es existieren Reparaturmechanismen für einige radiochemische Läsionen: Einmal der sog. "Host-Cell-Repair"-Mechanismus (HCR) (35, 41, 49, 103) und zum anderen wurden in manchen Viren, z. B. bei T1- und bei T4-Phagen, Gene gefunden, mit deren Hilfe Kettenbrüche repariert werden konnten (6, 12, 25, 35).
- c) Es gibt zwei Angriffspunkte an der NS. Wird der eine getroffen, kommt es zu einem reparierbaren Schaden, der aber evt. eine Mutation bewirken kann. Wird aber der andere getroffen, so wird das Virus inaktiviert (3, 4, 35, 54, 88).

Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß nicht nur die Nukleinsäure eines Virus, sondern auch andere Strukturteile strahlenempfindlich sind. So ergab z. B. die Berechnung des strahlenempfindlichen Anteils beim Poliovirus einen Wert, der größer als das Volumen der NS war (5). Versuche neueren Datums zeigen, daß auch das Virusprotein durch hohe Strahlendosen geschädigt wird (10, 26), und daß es während der Bestrahlung nicht nur zu Vernetzungen zwischen den NS-Molekülen sondern auch zwischen der NS und dem Protein kommt (9, 40, 69).

Der Wirkungsmechanismus der Virusinaktivierung beruht darauf, daß Gammastrahlen direkt oder indirekt auf das strahlenempfindliche Volumen einwirken. Die indirekte Wirkung entsteht

durch Bildung von Ionen und freien Radikalen in der Umgebung strahlenempfindlicher Strukturen, die dort chemische Reaktionen auslösen (vergl. 2.3.2 und 2.3.3). Sowohl direkte als auch indirekte Strahlenwirkungen manifestieren sich hauptsächlich an der NS. Nachdem die NS der Träger der genetischen Information des Virus ist, führt jede noch so geringe Änderung am Informationsgehalt zu einer Schädigung des Virus, die sich entweder durch Infektiositätsverlust oder durch Mutationen äußert.

Eine kritische Analyse aller bisherigen Daten über den Wirkungsmechanismus von Gammastrahlen auf Viren führt zu der Erkenntnis, daß wir hierüber leider noch nicht alles wissen. Teilweise widersprechen sich sehr viele Befunde, und es wird sicher noch eine geraume Zeit dauern, bis wir exakte Kenntnisse über die Virus-Inaktivierung durch Gammastrahlen besitzen.

2.3.2 Direkte Wirkung

"Direkt" bedeutet, daß die Strahlen direkt auf das Virus treffen. Dementsprechend erhält man direkte Strahleneinwirkungen, wenn die Viruspartikel möglichst in reiner Form vorliegen, z.B. kristallisiert. Bei lyophilisiertem und tiefgefrorenem Virus mit Proteinzusatz beruht der Strahleneffekt überwiegend auf einer direkten Einwirkung (35, 54, 57, 63). Unter diesen Bedingungen sind bisher folgende Schäden an Viren bzw. an isoliert bestrahlten Nukleinsäuren beschrieben worden:

Die NS-Basen wurden verändert (35, 55, 87, 96), Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche traten auf (26, 27, 29, 35, 53, 54, 72, 98) und bei hohen Strahlendosen bildeten sich Vernetzungen sowohl innerhalb der NS-Moleküle als auch zwischen den NS-Anteilen und dem Protein (1, 7, 9, 40, 69, 89, 98). Viruspräparate, die unter streng "direkten" Bedingungen bestrahlt werden, lassen sich gut miteinander vergleichen, da die Inaktivierung nur von der Virusart und dem Virusgehalt abhängig ist. Zwischen Bestrahlungstemperaturen von -180°C und $+30^{\circ}\text{C}$ soll sich das Bestrahlungsergebnis bei lyophilisiertem Virusmaterial beispielsweise nicht wesentlich verändern (34, 57). Die Vergleiche lassen sich einfach anhand der D_{37} -Werte (Dosis, bei der $e^{-1} = 37\%$ der betreffenden Viruspopulation noch nicht inaktiviert sind) bzw. D_{10} -Werte (Dosis, die notwendig ist, um die betreffende Viruspopulation um 1 log 10 zu reduzieren) durchführen.

2.3.3 Indirekte Wirkung

Eine "indirekte" Strahlenwirkung tritt neben dem "direkten" Effekt ein, wenn das Virus in flüssigem Medium betrahlt wird. Vom Wirkungsmechanismus her steht gleichfalls die Einwirkung auf die NS im Vordergrund. Diese wird durch die Bildung von Ionen und freien Radikalen wie $\text{H}^{\bullet}$, $\text{OH}^{\bullet}$, $\text{HO}_2^{\bullet}$, H_2O_2 , H_2 und e_{aq}^{-} im wässrigen Milieu bedingt (2, 14, 15, 57, 86, 99, 103).

Dabei kommt es vor allem zum Bruch der Phosphorester-Bindungen, zur Freisetzung von anorganischen Phosphaten und Purinbasen,

zur Oxydierung von Zuckerteilen, zu Desaminierung und Dehydroxylierung, zur Bildung von Hydroperoxiden sowie zu Strangbrüchen und Vernetzungen (7, 8, 35, 47, 55, 63, 85, 96, 100).

Neben der NS-Inaktivierung werden durch die indirekte Strahlenwirkung sicher noch andere Strukturbestandteile von Viren betroffen.

Durch Zugabe von Protein, Gelatine u. ä. soll man Virussuspensionen weitgehend vor den z. T. toxischen Einflüssen schützen können (15, 57, 63).

Auch niedrige Temperaturen sollen den indirekten Effekt vermindern. Denn mit steigender Temperatur erhöht sich die Anzahl der entstehenden Radikale (35).

Bei Virussuspensionen verkürzt sich die Bestrahlungszeit, da die Viren vielfältiger angegriffen werden.

Unter "indirekten" Bedingungen wird die Inaktivierungskinetik der Viren schwer kalkulierbar, da eine Abhängigkeit vom Infektiositätstiter, der Bestrahlungstemperatur, dem O_2 -Gehalt und der Anwesenheit schützender Substanzen zu beobachten ist.

2.3.4 Die Inaktivierungskinetik

Für die Inaktivierungskinetik von Viren durch Gammastrahlen sind die Viruskonzentration, der Aggregatzustand des Virusmaterials (kristallisiert, lyophilisiert, tiefgefroren oder flüssig), die Bestrahlungstemperatur und der O_2 -Gehalt von Bedeutung (siehe 2.3.2 und 2.3.3). Weiterhin verläuft die Inaktivierung in Abhängigkeit von der Strahlendosis und dem Zeitraum, in der sie einwirkt. Je geringer beispielsweise die Dosisleistung einer Bestrahlungsanlage ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß Schäden an der Nukleinsäure enzymatisch noch während der Bestrahlung repariert werden (11).

Da die Strahlenemission der Strahlungsquelle konstant bleibt, ist die Dosis proportional zur Bestrahlungszeit. Somit unterliegt die Inaktivierung dem Exponentialgesetz. Zur Darstellung der Kurve trägt man in einem Koordinatensystem den Logarithmus des noch nicht inaktivierten Virusanteils gegen die Dosis bzw. Bestrahlungszeit auf. Resultiert daraus eine Gerade, so spricht man von einer Reaktion I. Ordnung oder einem "single hit"-Prozeß. Ein derartiges Ergebnis würde einmal besagen, daß ein Treffer (= absorbierte Strahlenenergie) ausreicht, um ein Viruspartikel zu inaktivieren und zum anderen, daß jede infektiöse Einheit mit der gleichen Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit inaktiviert werden kann (35, 42).

Über eine exakte o. a. Kriterien in etwa entsprechende Inak-

tivierungskinetik von Mammalierviren durch Gammastrahlen gibt es bisher nur wenige Angaben. Die meisten Befunde lassen darauf schließen, daß es sich bei der Inaktivierungskinetik von Viren durch Gammastrahlen um eine Reaktion 1. Ordnung handelt.

2.3.5 Wirkung auf Vermehrungsfähigkeit und auf Strukturbestandteile eines Virus

Die meisten Untersuchungen über die Wirkung von Gammastrahlen auf Viren betreffen die Vermehrungsfähigkeit. Man untersuchte die Vermehrungsfähigkeit vor und nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen. Dabei wurde festgestellt, daß in einem bestimmten Dosis-Wirkungsbereich alle bisher untersuchten Viren ihre Vermehrungsfähigkeit in bestimmten Zellsystemen verlieren. Als Grundmechanismus wird primär die Schädigung der Virus-Nukleinsäure diskutiert (vergl. 2.3.1 - 2.3.3).

Jedes Virus ist komplex aufgebaut. Die "nackten" Viren besitzen neben der Nukleinsäure Proteine, die sich um die NS in kubischer oder helikaler Symmetrie anordnen, wodurch für jede Virusart typische Nukleokapside entstehen. Bei den behüllten Viren werden um die Nukleokapside noch Hüllen gebildet, die chemisch aus Proteinen, Lipiden und Kohlehydraten bestehen. Sie tragen unterschiedliche Aktivitäten, die für die Adsorption bzw. die Ausschleusung des Virus verantwortlich sind. Alle proteinhaltigen Strukturelemente eines Virus besitzen an-

tigene und z. T. auch immunisierende Wirksamkeit. Ein Virus besteht also aus mehreren, unterschiedlich wirksamen Antigenen, von denen einige für die immunisierende Wirksamkeit verantwortlich sind.

Über die Einwirkung von Gammastrahlen auf die antigenen und immunisierenden Strukturbestandteile eines Virus ist noch relativ wenig bekannt. Aus allen bisherigen Beobachtungen geht aber hervor, daß sich die antigenen und immunisierenden Bestandteile eines Virus gegenüber einer Gammabestrahlung anders verhalten als die Virus-Nukleinsäure. Die Virus-Nukleinsäure ist strahlenempfindlicher. So wurde mehrmals beobachtet, daß nach Verschwinden der Vermehrungsfähigkeit die antigenen Komponenten eines Virus voll aktiv waren (16, 22, 31, 32, 38, 43, 50, 54, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 93, 94, 101). Erst nach wesentlich höheren Dosen wurde auch die Antigenität des Virus geschädigt. Z. B. verminderte sich beim Tollwut-Virus nach einer Bestrahlung von 3 Mrad die Aktivität der Hämagglutinine nur um ein Viertel, während das Virus bereits nach dieser Dosis seine Vermehrungsfähigkeit verloren hatte (101). Beim Pferdeenzephalomyelitis-Virus, Stamm Venezuela, blieben die hämagglutinierenden Aktivitäten sogar bis zu einer Strahlendosis von 16 Mrad erhalten (80). Ähnliche Befunde liegen bezüglich immunisierender Eigenschaften von bestrahlten Viruspräparaten vor (16, 22, 30, 31, 32, 43, 50, 76, 82, 93, 94, 101). Aus diesen Gründen hat man in letzter Zeit die Inaktivierung mit Gammastrahlen auch für die Herstellung von Impfstoffen verwendet und dabei festgestellt, daß eine Gamma-Inaktivierung teilweise traditionellen Inaktivierungsverfahren zur Erhaltung der immunisierenden Eigenschaften überlegen ist (82, 83, 94, 101).

2.4 Inaktivierung von Pocken-, Pseudowut-, Newcastle Disease- und Reo-Viren durch Gammastrahlen

2.4.1 Pocken-Viren

Von den Pocken-Viren wurde als Modell bevorzugt das Vaccinia-Virus zu Bestrahlungsversuchen herangezogen. Im Vordergrund standen zunächst strukturelle Untersuchungen, Berechnungen des strahlenempfindlichen Volumens und seine Inaktivierungskinetik (17, 33, 44, 46, 57, 58, 68, 71, 102). In letzter Zeit betreffen die Untersuchungen auch die antigenen und immunisierenden Eigenschaften der Viren (16, 50).

Mehrere Autoren beobachteten, daß sich die Inaktivierungskurve unter direkten Bestrahlungsbedingungen aus zwei Komponenten zusammensetzte (17, 33, 44, 68, 71). Die Kurve verläuft zunächst steiler, dann flacher, d. h. einem hohen, scheinbar strahlenempfindlicheren Anteil stehen wenige, scheinbar resistente Viruspopulationen gegenüber. Die Ursachen sind noch nicht genügend bekannt und werden von verschiedenen Autoren sehr widersprüchlich gedeutet. So erklärten *Palacios et al.* (71) die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit mit der Entdeckung von *Pfau* und *McCrea* (73), daß die DNS beim Pocken-Virus sowohl in einsträngiger als auch in doppelsträngiger Form vorliegen kann. *Jiménez* und *Ohlbäum* (44) meinten, daß Zelltrümmer und Serum für dieses Phänomen verantwortlich wären. *Friesen et al.* (33) vermuteten eine Stabilisierung während des Bestrahlungsvorgangs. *Decker, Guir* und *Kirn* (17) ver-

wiesen auf die Ergebnisse von D e f e n d i, J e n s e n und S a u e r (18) beim SV 40-Virus. Diese stellten nämlich fest, daß bestrahltes Virus, das seine infektiösen Eigenschaften verloren hat, in der Wirtszelle noch DNS synthetisieren kann.

Verschiedene Wissenschaftler beschrieben eine einfache exponentiale Form der Vaccinia-Inaktivierungskurve. Doch hatten sie keine Meßwerte bis zu einer Dosis von 500 krad angegeben (46,57,58,102).

Die für eine Inaktivierung notwendigen Strahlendosen variieren bei den einzelnen Autoren dagegen nur gering. Die Einzeldaten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Bei den in Tabelle 1 zusammengefaßten Angaben handelt es sich durchwegs um ältere Arbeiten, in denen häufig weder die Virusausgangstitel noch sonstige für die Beurteilung einer Inaktivierungskinetik notwendigen Daten, z.B. Temperatur usw., angegeben sind. Ein Vergleich der Angaben ist deshalb problematisch.

Nach K a p l a n (50) und D ě a n e š, H r u š k o v a & B l a ť e k (16) behält das Vaccinia-Virus seine antigenen und immunisierenden Eigenschaften nach der Bestrahlung mit Gammastrahlen bei.

T A B E L L E 1

Zusammenstellung der Literaturangaben über die Inaktivierung
des Vaccinia-Virus durch Gammastrahlen

Zustand des Virus- materials	D ₃₇ -Wert (krad)	Autor	Jahr
trocken	8×10^4	Lea & Salaman (58)	1942
trocken	2×10^2	Jordan & Kempe (46)	1956
trocken	4×10^4	Mc Crea (68)	1960
trocken	1×10^5	Wilson (102)	1961
trocken	$2.5-4.9 \times 10^4$	Jiménez & Ohlbaum (44)	1966
$-70^\circ\text{C} +$ $10\% \text{ KS}^*)$	7×10^4 23×10^4	1. Komp. 2. Komp.	1969
keine Temperaturanga- ben; $10\% \text{ HS}^*)$	3.5×10^4 5.2×10^5	1. Komp. 2. Komp.	1963
keine Temperaturanga- ben; $10\% \text{ HS}^*)$	$4-5.6 \times 10^4$ 15.5×10^4	1. Komp. 2. Komp.	1963

*) KS = Kälberserum

HS = Pferdeserum

2.4.2 Pseudowut-Virus

Informationen über Gamma-Inaktivierung des Pseudowut-Virus fanden sich bei *F r e s c u r a* (30) und *D i l o v s k i* (22).

F r e s c u r a führte seine Versuche mit flüssigem (Bestrahlungstemperatur 16°C - 18°C), tiefgefrorenem (-70°C) und lyophilisiertem Pseudowut-Virus durch. Angaben über den verwendeten Virusstamm fehlen. Die Inaktivierung verlief jeweils als Reaktion I. Ordnung.

Folgende D_{10} -Werte ließen sich aus den Angaben von *F r e s c u r a* ermitteln:

flüssiges Virus.....	etwa 103 krad
tiefgefrorenes Virus.....	etwa 508 krad
lyophilisiertes Virus.....	etwa 471 krad

D i l o v s k i untersuchte die Kinetik der Gamma-Inaktivierung des Pseudowut-Virus und einige auf ihren Verlauf einwirkende Faktoren mit Hilfe der Stämme Popović und $\text{PM}_{\text{uv}}^{+}$. Bis zu einer Bestrahlungstemperatur von 40°C verliefen seine Inaktivierungskurven logarithmisch linear. Jedoch ab dieser Temperatur erhielt er 2-Komponentenkurven, die er aus dem Zusammenwirken von zwei verschiedenen Faktoren, nämlich Gammabestrahlung und Wärmeeffekt, erklärt. Die Einzeldaten sind in Tab.2 zusammengestellt.

Beide Wissenschaftler wiesen im Challenge nach, daß das be-

TABELLE 2

Bestrahlungsversuche und Ergebnisse beim Pseudowut-Virus (nach Dilovski)

a) Abhängigkeit vom Aggregatzustand, in dem das Virus vorliegt:

Zustand	Dosis (krad)	Titerabfall (in log 10)	D ₁₀ -Wert (krad)
lyoph.	2 000	5	400
-70°C	3 000	6	500
Nährmed.o.FRS u.Phenolrot	500	4	135

b) Abhängigkeit vom Virusgehalt:

Virusgehalt	Dosis (krad)	Titerabfall (in log 10)	D ₁₀ -Wert (krad)
10 ⁷	2 000	5	400
10 ⁵	1 000	4	250
10 ³	500	3	167

c) Abhängigkeit von der Bestrahlungstemperatur:

Temperatur	Dosis (krad)	Titerabfall (in log 10)	D ₁₀ -Wert (krad)
-70 °C	1 000	2	500
0- 4°C	1 000	4	250
18-22°C	700	4	175
40-42°C	400	4	100
60-65°C	300	4	75
80°C	100	4	25

strahlte Virus seine immunisierenden Eigenschaften noch voll entfalten konnte.

2.4.3 Newcastle Disease-Virus

Für die Inaktivierung des ND-Virus liegen Untersuchungen von Sullivan et al. (91) mit dem Stamm Hitchner B 1 und DiGiogia et al. (21) mit dem Stamm California vor.

Sullivan et al. vermehrten das Virus in Affennierenzellen (*Cercopithecus aethiops*). Die Bestrahlung erfolgte nach Verdünnung auf einen Ausgangstiter von 10^4 PFU/ml unter Zusatz von 2 % fötalem Rinderserum an einer ^{60}Co -Quelle bei einer Temperatur von 0.5°C . Bei dieser Versuchsanordnung betrug der D_{10} -Wert 520 krad.

DiGiogia et al. führten Bestrahlungsversuche bei verschiedenen Temperaturen durch. Die Inaktivierungskurven verliefen bis zu einer Temperatur von 37.8°C linear, wiesen dann aber eine 2-Komponentenkinetik auf. Nach einer Dosis von 1.25×10^6 rad bei einer Temperatur von 2.2°C fiel der Infektiositätstiter um $7.5 \log 10$. Der HA-Titer zeigte nach dieser Dosis noch keine Veränderung. Der D_{10} -Wert lag bei ca. 170 krad.

2.4.4 Reo-Virus

Über die Inaktivierung von Reo-Viren existieren nur Angaben von S u l l i v a n et al. (91). Sie benutzten für ihre Versuche Reo-Virus, Typ 1. Die Versuchsanordnung entspricht der beim ND-Virus (siehe 2.4.3). Der D_{10} -Wert betrug 420 krad.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Virusarten

Hühnerpocken-Virus (Avipoxvirus gallinae), Stamm HP-1, Kultur-virus der 442. Passage in Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE).

Die Vermehrung des Virus erfolgte in FHE-Primärkulturen, die aus 10 Tage bebrüteten Hühnerembryonen nach der Methode von M a y r und K a l c h e r (67) gewonnen wurden.

Zusammensetzung des Anzuchtmediums:

78 % Earle'sche Salzlösung
10 % Fötale Rinderserum (FRS)
10 % Hydrolysiertes Laktalbumin (in 5 %iger Lösung) (LA)
1,5 % Phenolrot (in 1 %iger Lösung) (Ph)

und Antibiotika (100 I.E. Penicillin u. 100 γ Streptomycin pro ml).

Als Erhaltungsmedium diente Rinderamnionflüssigkeit (RAF), die 1,5 % Phenolrotlösung und Antibiotika (s. o.) enthielt.

Herstellung der Virus-Stamm suspension: Bei FHE-Zellen, die in Penicillin-Flaschen zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren, wurde das Anzuchtmedium der Kultur durch Erhaltungsmedium ersetzt, die Zellen mit 8 ml Virussuspension (Titer: $10^{7.5}$ KID₅₀/ml) pro Flasche (Zusatz zum Medium) infiziert und bei 37°C weiterbe-

brütet. Am 4. Tag post inf., nach Eintritt eines cytopathischen Effektes (cpE) von etwa 70 %, wurde die Kultur geerntet. Im Anschluß an ein Gefriertauen (-20°C) wurde die Virus-Zellsuspension 15 Min. bei 200-250 Watt pulsierend mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier B 30), Zellreste anschließend 10 Min. abzentrifugiert (1 500 UpM, 4°C) und der Überstand als Virus-Stammsuspension benutzt. Die Stammsuspension enthielt $10^{7.5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$.

Pseudowut-(Aujeszky-) Virus, Stamm Hannover II, Kulturvirus der 11. Passage in Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen (BEL).

Zur Vermehrung des Virus wurden Kulturen aus embryonalen Rinderlungen angelegt (Methode nach M a d i n, A n d r i e s e und D a r b y) (64) und nach Auswachsen eines dichten Zellrasens im Verhältnis 1 : 1 geteilt (1. Subkultur).

Das Anzuchtmedium bestand aus 78 % Eagles "Minimal Essential Medium" (MEM), 10 % FRS, 10 % LA, 1,5 % Ph und dem üblichen Antibiotikazusatz. Das Erhaltungsmedium entsprach dem Anzuchtmedium, enthielt aber an FRS und LA nur je 5 %.

Herstellung der Virus-Stammsuspension: Dichtgewachsene, in Penicillin-Flaschen angezüchtete BEL-Zellen der 1. Sub-

kultur wurden mit Erhaltungsmedium beschickt, 0.02 ml Stammvirus (Titer: $10^{8.0} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) zugegeben und bei 37°C weiterbebrütet. Nach zwei Tagen war der Zellrasen der Kultur zu 80 - 100 % virusspezifisch zerstört. Die Kulturen wurden dann kurzfristig bei -70°C eingefroren, nach dem Auftauen mit Ultraschall behandelt, anschließend niedertourig abzentrifugiert und der Überstand als Stammsuspension gewonnen. Der Virusgehalt der Stammsuspension betrug $10^{8.0} \text{KID}_{50}/\text{ml}$.

Ein Teil der Suspension wurde in Penicillin-Fläschchen à 3 ml abgefüllt und lyophilisiert (Christ, Delta 1a). Das Lyophilisat enthielt $10^{7.25} \text{KID}_{50}/\text{ml}$.

Reo-Virus, Typ 1, Kulturvirus der 10. Passage in Vero-Zellen (Affennieren-Zelllinie).

Die Virusvermehrung erfolgte in Vero-Zellkulturen, die regelmäßig im Verhältnis 1 : 2 geteilt wurden.

Das Anzuchtmedium enthielt MEM, 10 % FRS, 10 % LA, 1.5 % Ph und den gebräuchlichen Antibiotikazusatz. Dem Erhaltungsmedium wurden nur 5 % FRS und 5 % LA zugesetzt.

Herstellung der Virus-Stammsuspension: Von in Roux-Flaschen dichtgewachsenen Vero-Zellen wurde das Anzuchtmedium entfernt, die Zellen mit 5 ml Virussuspension (Titer: $10^{6.5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) überschichtet und dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Virusadsorption). Anschließend wurde Erhaltungsmedium in die Fla-

schen eingefüllt, die Zellkulturen bei 37°C weiterbebrütet und nach 3-4 Tagen bei ca. 80 % cpE geerntet. Die Kulturen wurden kurzfristig bei -70°C eingefroren, nach dem Auftauen 30 Sekunden bei 40-50 Watt beschallt und dann abzentrifugiert (10 Min./ 1 500 UpM/ 4°C). Der Überstand diente als Stammsuspension. Die Stammsuspension enthielt $10^{6.25} \text{KID}_{50}/\text{ml}$.

Newcastle Disease-Virus (NDV), Stamm Hitchner B 1, Kulturvirus der 5. Eipassage (Allantoisflüssigkeit).

Herstellung der Virus-Stammsuspension: Die Allantoisflüssigkeit 10 Tage vorbebrüteter und dann infizierter Hühnerembryonen (0.1 ml Virusmaterial pro Ei, nach Verdünnung der Ausgangssuspension auf einen Virus-Titer von $10^{3.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ wurde am 3. Tag p. inf. geerntet und durch Gefriertauen bei -70°C und nachfolgender Zentrifugation (10 Min./ 3 000 UpM/ 4°C) partiell gereinigt.

Die Virus-Stammsuspension enthielt $10^{9.5} \text{EID}_{50}/\text{ml}$.

Alle Virus-Stammsuspensionen wurden bis zur Verwendung in Mengen von ca. 500 ml in Plasmaflaschen bei -70°C aufbewahrt. Die Lyophilisate lagerten bis zu Versuchsbeginn bei +4°C.

In Tabelle 3 sind die wesentlichen Viruseigenschaften der vier verwendeten Virusarten zusammengestellt.

T A B E L L E 3

Die wesentlichen Charakteristika der verwendeten Virusarten

Familie (-viridae)	Genus (-virus)	Spezies	NS-Typ	NS-Strang	Molekular- gewicht NS x 10 ⁶	Gene ca.	Hülle	Viriongröße nm
Pox-	Avipox-	Hühnerpocken (Avipoxvirus gallinae)	DNS	doppelt, linear, negativ	200-240	160	+	390 x 260
Herpeto-	Herpes-	Pseudowut (Herpesvirus suis I)	DNS	doppelt, linear, negativ	100-120	100	+	150 - 170
Paramyxoxo-	Paramyxoxo-	Newcastle Disease	RNS	einfach, linear, negativ	7	14	+	150 - 300
Reo-	Reo-	Reo, Typ 1	RNS	doppelt, linear, 10 Mol, negativ	14- 15	15	-	75 - 80

3.1.2 Nachweisverfahren

Folgende Kultursysteme dienen zum Nachweis der Virus-Infektiosität:

Hühnerpocken-Virus: Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten. Der Virusnachweis wird in diesen Kulturen anhand des fortschreitenden cpE geführt, der nach 3-7 Tagen ablesbar ist.

Pseudowut-Virus: Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen. Der Virusnachweis in den BEL-Kulturen erfolgt anhand des cpE, der 2-5 Tage p. inf. eintritt und bei Vorliegen von kulturinfektiösem Virus im Inokulum immer zur vollständigen Kulturzerstörung führt.

Reo-Virus: Affennieren-Zelllinie "Vero". Der Virusnachweis ist anhand des cpE in diesen Zellen möglich, das Ergebnis nach dem 5.-8. Tag ablesbar.

Newcastle Disease-Virus: Allantoishöhlen-Impfung bei 10 Tage vorbebrüteten, vollempfänglichen Hühnereiern. Die Hühnerembryonen sterben nach Infektion mit dem NDV-Stamm Hitchner B 1 nicht ab. Die Infektion wurde anhand der Hämagglutininbildung im Verlauf der Virusvermehrung in der Allantoisflüssigkeit der Reagenzien nachgewiesen. 3 Tage nach der Infizierung wurde ein

Hämagglutinationstest (HA) durchgeführt:

Auf Mikroplatten wurden je ein Tropfen (0.025 ml) physiologische Kochsalzlösung (0.9 %ig), ein Tropfen Antigen (Allantoisflüssigkeit) verschiedener Verdünnungsstufen (bis 1 : 256) und ein Tropfen einer 1 %igen Hühnererythrozytensuspension vermischt. Nach Sedimentierung der Erythrozyten (1/2 Std. $\pm$ 10 Min. bei Zimmertemperatur) konnte der HA-Titer der jeweiligen Ei-Allantoisflüssigkeit abgelesen werden. Die Bewertung des Sedimentationsmusters erfolgte nach dem in R o l l e / M a y r (84) beschriebenen Schema.

3.1.3 Virustitrierungen

Zur Bestimmung der mittleren kultur- bzw. eiinfektiösen Dosis (KID₅₀ bzw. EID₅₀) wurden die Proben mit PBS-Lösung in Zehnerpotenzen verdünnt und je 0.1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen auf jeweils 4 Reagenten der verschiedenen Nachweissysteme (s. o.) verimpft.

Ausgewertet wurde anhand der cytopathischen Effekte bzw. bei den Bruteiern mittels HA.

Die Berechnung der Virustiter (auf ein Volumen von 1 ml) erfolgte nach der Methode von K ä r b e r (48) und S p e a r m a n (90) in 50 % kultur- bzw. eiinfektiösen Dosen (KID₅₀ bzw. EID₅₀).

3.1.4 Restvirusnachweis

Zum Restvirusnachweis sind alle die Proben herangezogen worden, in denen sich bei den Nachweisverfahren nach 3.1.2 kein Virus mehr nachweisen ließ. Das Prinzip beruht darauf, durch Subpassagen der überimpften negativen Zellkulturen (Pseudowut- und Reo-Virus) oder durch Weiterpassieren der aufgeschlossenen Zellkulturen (Hühnerpocken-Virus) bzw. der negativen Allantoisflüssigkeit (ND-Virus) evt. noch vorhandenes Restvirus, das sich bei der einfachen Animpfung dem Nachweis entzogen hatte, aufzufinden.

Pseudowut-Virus

Auf dichte, sekundäre BEL-Zellen in Vierkantflaschen wurden 2 ml unverdünnten Probenvolumens verimpft. Um radiotoxische Erscheinungen an den Kulturzellen zu vermeiden, wurde 3 - 4 Stunden später ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die Zellkulturen wurden 5 Tage lang beobachtet. Trat kein cpE auf, wurde von der beimpften Kultur eine Subkultur angelegt und auch diese 5 Tage lang untersucht.

Hühnerpocken-Virus

FHE-Zellen wurden wie die BEL₂-Zellen beimpft. Die Beobachtung der Kulturen lief 9 Tage lang. Beimpfte Kulturen ohne cpE wurden dann bei -70° C eingefroren, aufgetaut und die geerntete Suspension durch Ultraschall (30 Sec./40 - 50 Watt) aufgeschlossen. Mit dem Überstand des abzentrifugierten Kulturmaterials

wurden erneut 5 FHE-Kulturröhrchen mit je 0.2 ml beimpft und nochmals über den gleichen Zeitraum beobachtet.

Newcastle Disease-Virus

2 ml der bestrahlten Probe wurden mit PBS im Verhältnis 1 : 5 verdünnt und 20 vorbebrütete Hühnereier mit jeweils 0.5 ml beimpft. Am 3. Tag p. inoculationem wurde die HA mit den Allontoisflüssigkeits-Proben eines jeden Eies durchgeführt. Von den geernteten Allontoisflüssigkeiten wurden daneben nochmals 20 vorbebrütete Hühnereier mit je 0.5 ml beimpft (2. Subpassage) und nach 3 Tagen eine evt. Virusvermehrung wie oben mittels HA überprüft.

Der Rest der bestrahlten Probe wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Spinco L2 65B) 20 Min. bei 20 000 UpM zentrifugiert, Überstand und Sediment getrennt und jeweils (nach Resuspendierung des Sediments) der HA-Titer festgestellt.

Reo-Virus

Der Restvirusnachweis erfolgte analog dem Pseudowut-Virus, aber in Vero-Zellen. Nach dem 1. und dem 6. Tag wurde das Medium der beimpften Kulturen gewechselt.

Die Kulturen wurden 9 Tage lang auf cpE beobachtet.

3.1.5 Strahlungsquelle

Benutzt wurde eine ^{60}Co -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, LTD) im Institut für Biologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg. ^{*)}

Die Dosisleistung der Gammacell betrug zu Beginn der Versuche 19.5 krad/Min. $\pm$ 8 % in der Mitte der Kammer (gemessen in H_2O). Sie verringerte sich pro Monat um ca. 1 %.

^{*)} Für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich der GSF recht herzlich.

3.1.6 Versuchsanordnung

Vorbereitung der Virussuspensionen vor der Bestrahlung

Die Virussuspension wurde aufgetaut, Proben à 10 ml in Glasfläschchen mit Metallschraubkappen und Silikongummi-Dichtungen abgefüllt und wie die lyophilisierten Proben bei + 4°C gehalten. Der Transport zur Bestrahlungsanlage erfolgte in einem vorgekühlten Thermogefäß.

Bestrahlung der flüssigen Virussuspensionen

a) ohne Wärmeschutz

In die Kammer der Bestrahlungsquelle wurden jeweils 6 Probenfläschchen so konzentrisch eingeordnet, daß jedes Gefäß bei gleicher Bestrahlungszeit der gleichen Strahlendosis ausgesetzt war. Die Abstufung der Bestrahlungsdosen erfolgte durch Bestrahlung über verschiedene Zeitintervalle.

b) mit Wärmeschutz

Um den Einfluß der Wärmeentwicklung in der Kammer so gering wie möglich zu halten, wurden bei der Mehrzahl der Versuche die Fläschchen in einem mit Alufolie umgebenen Styroporbehälter bestrahlt. Die Anordnung der Probengefäße wurde nicht geändert.

T A B E L L E 4

Wärmeentwicklung in den Fläschchen
während der Bestrahlung

Zeit (Min.)	ohne Styropor (°C)	mit Styropor (°C)
50	33	30
60	35	32
100	39	39
110	41	41

Bestrahlung von lyophilisiertem Virus

Ein Penicillinfläschchen mit lyophilisiertem Virus wurde jeweils in ein doppelwandiges Durchfluß-Gefäß aus Jenaer-Glas gestellt. Oben und unten wurde die Kammerwärme durch Styroporeinsätze abgeschirmt. An den Seiten isolierte kontinuierlich fließendes Leitungswasser (Temperatur 15°C) den Probenbehälter gegen die Kammerwärme. Das Gefäß wurde in der Mitte der Kammer aufgestellt.

Parallel zu jedem Bestrahlungsversuch wurden Kontrollsuspensionen und Lyophilisate, die nicht bestrahlt, aber den gleichen Bedingungen unterworfen waren, auf Virusgehalt ausgetestet.

Alle Versuche wurden zweimal durchgeführt.

3.2 Versuche und Ergebnisse

3.2.1 Strahleninaktivierung beim Hühnerpocken-Virus

Die Inaktivierung beim Hühnerpocken-Virus verlief nach einer Reaktion I. Ordnung. Trägt man den Virusgehalt der Einzelproben gegen die jeweilige Bestrahlungsdosis (Faktor aus Dosisleistung der Strahlungsquelle x Bestrahlungszeit) auf, so erhält man eine Gerade (vergl. Abb. 1).

Ab einer Strahlendosis von 1 140.0 krad war vermehrungsfähiges Virus nur noch über die Restvirus-Nachweisteknik erfaßbar. Nach einer Dosis von 1 400.0 krad ließ sich in 2 ml der bestrahlten Probe kein Virus mehr nachweisen. Der D_{10} -Wert betrug ca. 187.0 krad.

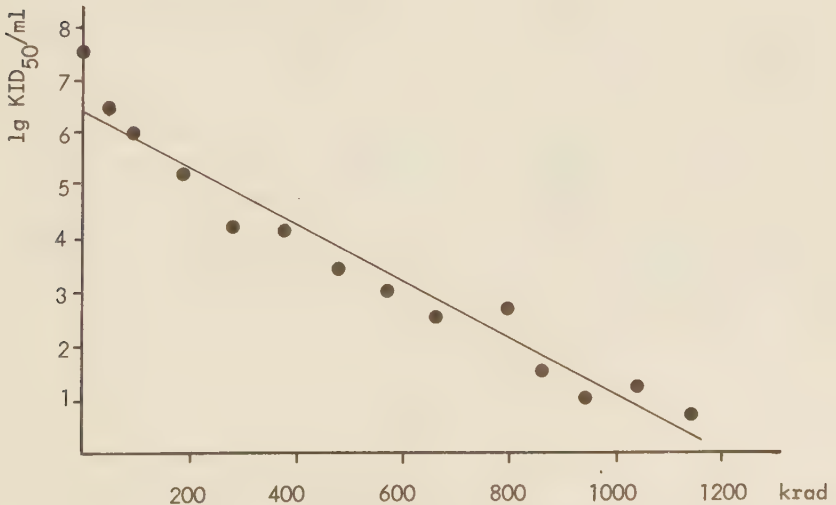


Abb. 1: Inaktivierungskinetik beim Hühnerpocken-Virus, Stamm HP-1 (attenuiert)

3.2.2 Strahleninaktivierung beim Newcastle Disease-Virus

Die Strahleninaktivierung beim ND-Virus verlief als Reaktion I. Ordnung.

Vermehrungsfähiges Virus konnte bis zu einer Dosis von 1870.0 krad nachgewiesen werden. Im Restvirusnachweis waren die Endproben erst nach einer Gesamtbestrahlung mit 2 057.0 krad negativ. Der D_{10} -Wert betrug ca. 258 krad (vergl. Abb. 2).

Neben der Inaktivierungskinetik ist auch der HA-Gehalt der bestrahlten Suspensionen überprüft worden. Die Titer lagen einheitlich bei 1 : 64, selbst bei den Proben, die eine Dosis von 2 057.0 krad empfangen hatten. Nach der Ultrazentrifugierung dieser Proben (Abtrennung der inaktivierten Viruspartikel) wiesen sowohl das volumengleich aufgenommene Sediment als auch der Überstand einen HA-Titer von 1 : 64 auf.

Die Versuche weisen darauf hin, daß in dem angegebenen Dosisbereich die hämagglutinierenden Aktivitäten des Virus bzw. die den Hämagglutininen zugrunde liegenden Virusstrukturen nicht zerstört werden.

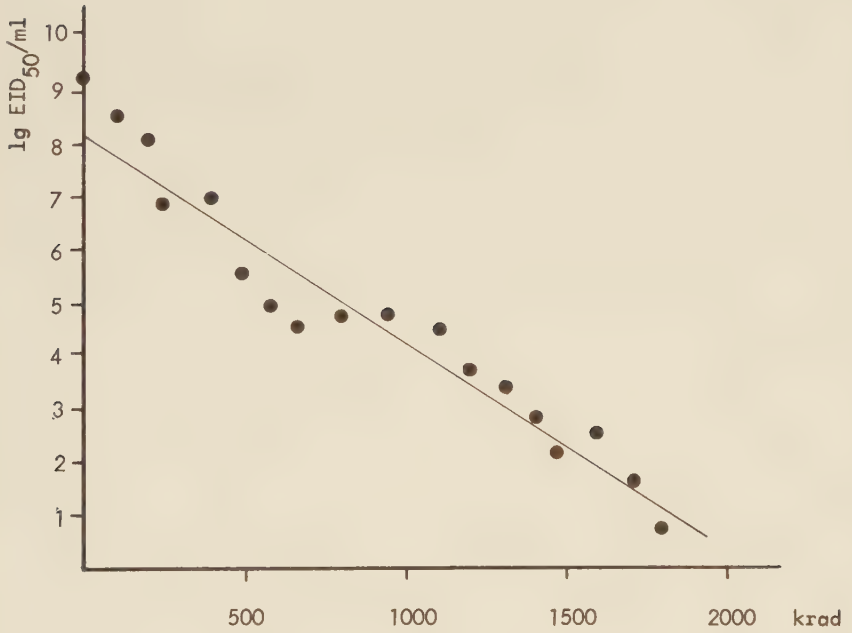


Abb. 2: Inaktivierungskinetik beim ND-Virus, Stamm Hitchner B 1

3.2.3 Strahleninaktivierung beim Reo-Virus

Die Strahleninaktivierung bei Reo-Virus, Typ 1, verlief ebenfalls nach einer Reaktion I. Ordnung.

Für eine vollständige Inaktivierung war eine Strahlendosis von 1 910.0 krad notwendig. Der D_{10} -Wert betrug ca. 400 krad. In Abb. 3 ist die Inaktivierungskinetik wiedergegeben.

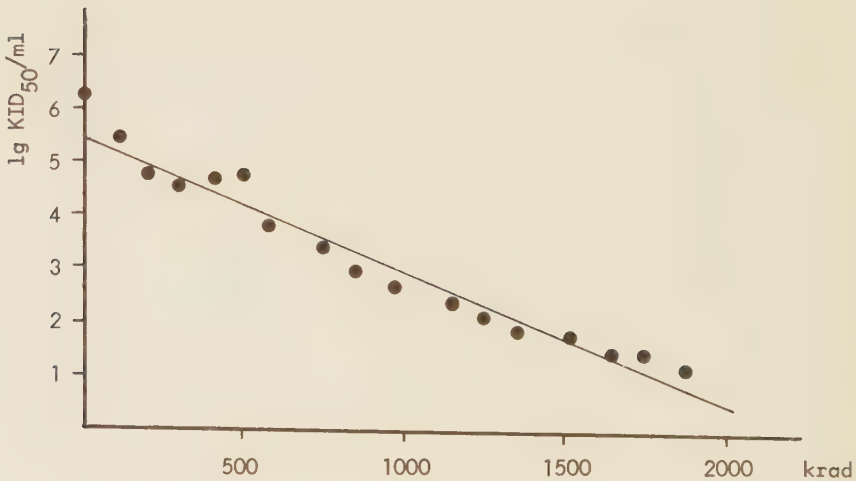


Abb. 3: Inaktivierungskinetik beim Reo-Virus, Typ 1

3.2.4 Strahleninaktivierung beim Pseudowut-Virus

Mit dem Pseudowut-Virus wurden 4 verschiedene Versuche durchgeführt, um verschiedene Einflüsse auf den Inaktivierungsprozeß wie eine Styropor-Wärmeabschirmung, erhöhter Proteingehalt und Gefriertrocknung des Virus zu untersuchen.

a) Bestrahlung ohne Styroporschutz

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, entspricht auch beim Pseudowut-Virus die Inaktivierung einer Reaktion I. Ordnung. Die vollständige Inaktivierung wurde mit einer Strahlendosis von 965.0 krad erreicht. Der D_{10} -Wert betrug ca. 138 krad (vergl. Abb. 4).

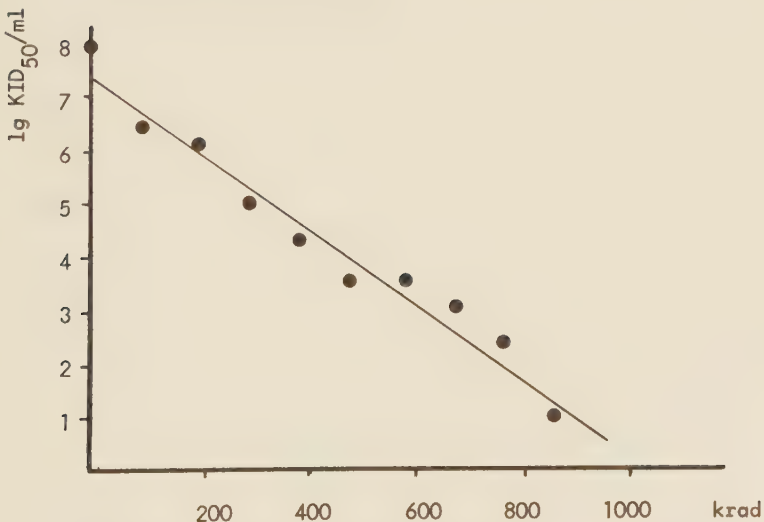


Abb. 4: Inaktivierungskinetik beim Pseudowut-Virus ohne Styroporschutz

b) Bestrahlung mit Styroporschutz

Der Styroporschutz nahm nur einen geringen Einfluß auf die Inaktivierungskinetik. Die Inaktivierung verlief wiederum nach einer Reaktion I. Ordnung.

Die Inaktivierungsenddosis betrug 1 061.5 krad, der D_{10} -Wert ca. 147 krad. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefaßt.

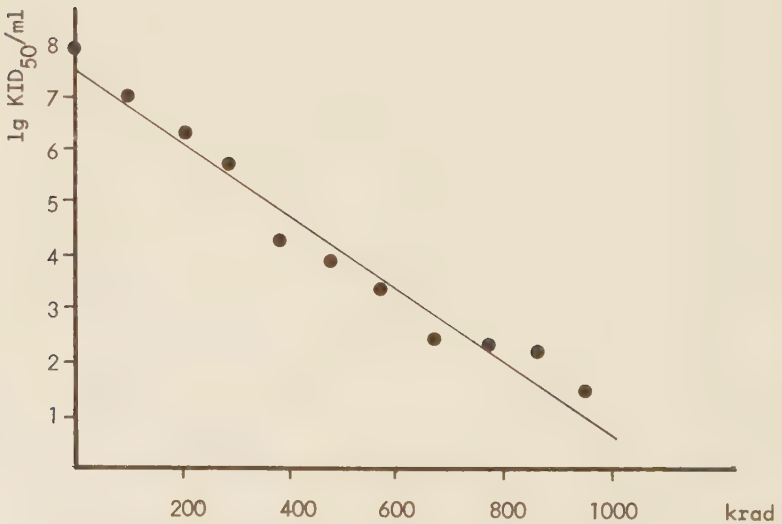


Abb. 5: Inaktivierungskinetik beim Pseudowut-Virus mit Styroporschutz

c) Bestrahlung einer Virussuspension mit erhöhtem Proteingehalt

Die Virus-Stammsuspension enthielt 5 % fötales Rinderserum, was einem Rohproteingehalt von etwa 0,3 % entspricht. Für diesen Versuch wurde die doppelte Menge an FRS zugesetzt.

Der Proteinzusatz übte keinen signifikanten Einfluß auf die Inaktivierungskinetik aus.

Die Inaktivierung verlief ebenfalls nach einer Reaktion I. Ordnung. Die Inaktivierungsenddosis betrug 1 028,5 krad, der D_{10} -Wert ca. 140 krad (siehe Abb. 6).

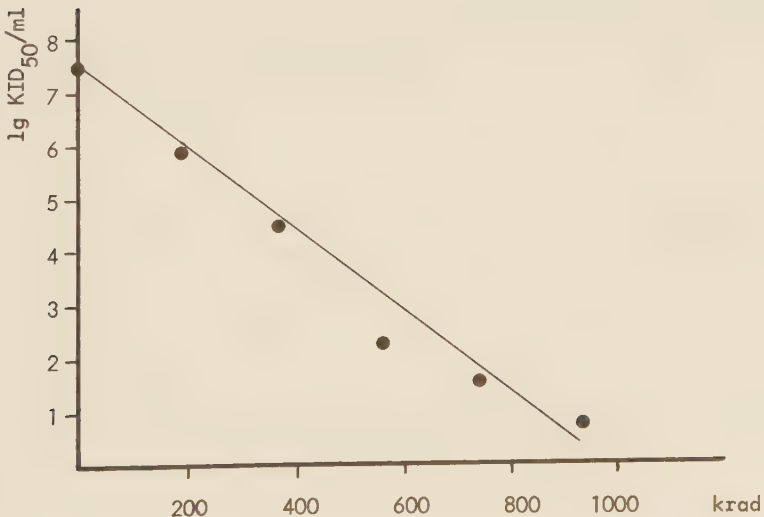


Abb. 6: Inaktivierungskinetik beim Pseudowut-Virus unter erhöhter Proteinbelastung

d) Bestrahlung von lyophilisiertem Virus

Die Inaktivierung verlief nach einer Reaktion I. Ordnung.

Zur Inaktivierung des lyophilisierten Virus war eine 3 x höhere Dosis notwendig als zur Inaktivierung der Virussuspensionen. Zur restlosen Inaktivierung des gesamten Virus im Lyophilisat waren 3 000.0 krad erforderlich. Der D_{10} -Wert betrug ca. 467 krad. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 graphisch dargestellt.

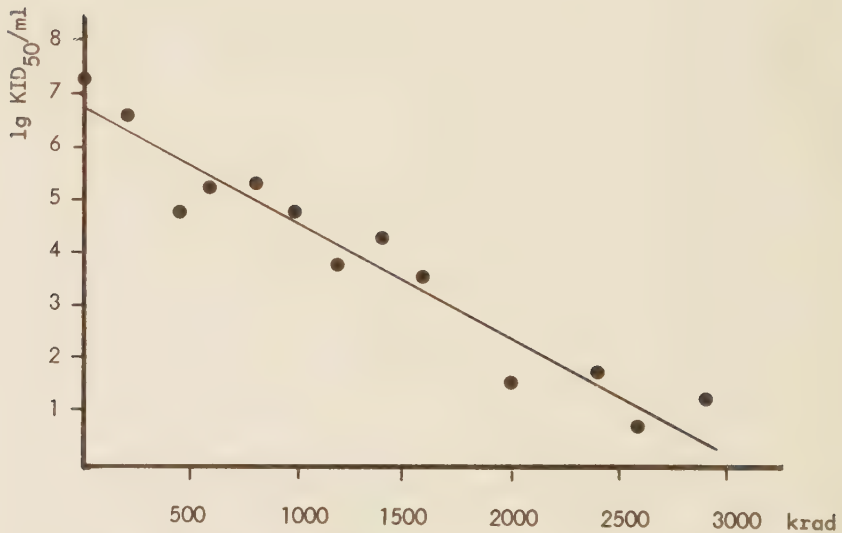


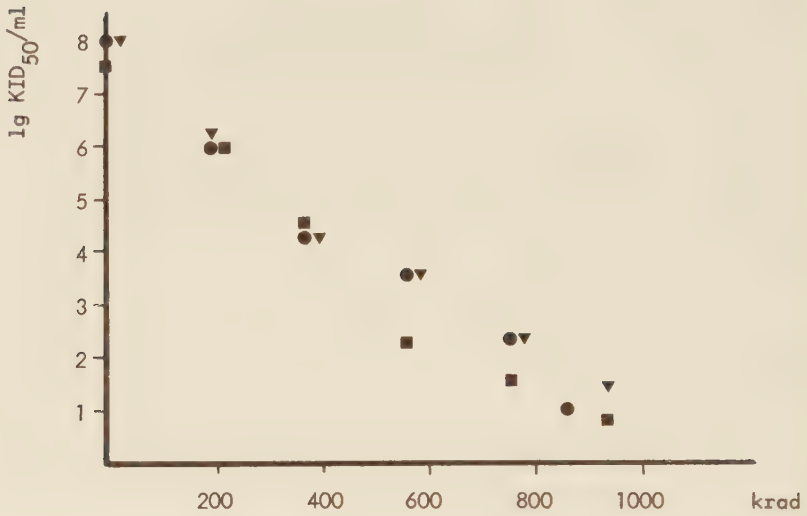
Abb. 7: Inaktivierungskinetik beim lyophilisierten Pseudowut-Virus

e) Einfluß von Wärmeentwicklung, Proteingehalt und Gefrier-
trocknung (Vergleich der Versuche a, b, c und d)

Signifikante Unterschiede in der Inaktivierungskinetik zwischen den Virussuspensionen mit unterschiedlichem Proteinanteil bzw. bei Bestrahlung mit und ohne Wärmeschutz ließen sich nicht ermitteln. Alle Meßwerte lagen innerhalb der mathematischen Streuung für Titrierungen in Zehnerpotenzen mit je 4 Reagenten ($0.9 \log$). Der Wärmeabschirmung mittels Styropor und Alufolie - ihre Effektivität ist sehr gering (vergleiche Tab. 4) - dürfte bei der angewendeten Versuchsanordnung eine ebenso geringe Bedeutung zukommen wie einem Unterschied im Proteingehalt von Kultur-Virussuspensionen. In Abb. 8 sind zunächst die Versuche mit und ohne Styropor-Wärmeschutz sowie mit erhöhtem Proteingehalt gegenübergestellt.

Zur Strahleninaktivierung von gefriergetrocknetem Virus aber war eine weit höhere Dosis erforderlich. Beim Pseudowut-Virus lagen die Bestrahlungswerte von D_{10} und Enddosis jeweils um den Faktor 3 höher.

Die Bestrahlungsergebnisse der verschiedenen Versuche mit dem Pseudowut-Virus sind in Tab. 5 zusammengefaßt.



● = ohne Styroporschutz - 5 % FRS

▼ = mit Styroporschutz - 5 % FRS

■ = mit Styroporschutz - 10 % FRS

Abb. 5: Vergleich der Versuche a, b und c beim Pseudowut-Virus

T A B E L L E 5

Übersicht über die Bestahlungsergebnisse bei den einzelnen Pseudowut-Viruspräparaten

Zustand des Virusmaterials	Rohprote- ingehalt (%)	Virusgehalt (KID ₅₀ /ml bzw. EID ₅₀ /ml)	D ₁₀ -Wert (krad)	Dosis zur vollstän- digen Inaktivierung (krad)
flüssig	ohne Styroperschutz	10 ^{8.0}	138	965.0
	mit Styroperschutz	10 ^{8.0}	147	1 061.5
	mit Styroperschutz	10 ^{7.5}	140	1 028.5
lyophilisiert	0.3	10 ^{7.5}	467	3 000.0

3.2.5 Unterschiede in der Strahlenresistenz von Hühnerpocken-, Newcastle Disease-, Reo- und Pseudowut-Viren

Eine vergleichende Beurteilung der Strahlenempfindlichkeit der verschiedenen Virusarten ist bei unterschiedlichem Ausgangs-Virusgehalt nur anhand des D-Wertes möglich. Am labilsten verhielt sich nach diesem Parameter das Pseudowut-Virus, gefolgt vom Hühnerpocken- und ND-Virus. Sehr deutlich ist der Abstand von diesen drei Virusarten von dem sehr strahlenresistenten Reo-Virus.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aus den Bestrahlungsversuchen an den vier Virusarten, suspendiert in flüssigem Medium mit 0.15 % (Hühnerpocken-Virus), 0.3 % (Reo- und Pseudowut-Virus) bzw. 0.85 % Rohprotein (ND-Virus) gegenübergestellt.

Im Gegensatz zur unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit der geprüften vier Virusarten verlief die Inaktivierung einheitlich nach einer Reaktion I. Ordnung.

T A B E L L E 6 Strahlenresistenz der vier untersuchten Virusarten

Virusart	Rohprotein- gehalt (%)	Virusgehalt (KID ₅₀ /ml bzw. EID ₅₀ /ml)	D ₁₀ -Wert (krad)	Dosis zur vollständigen Inaktivierung (krad)
Pseudowut	0.3	10 ^{8.0}	147	1 061.5
Hühnerpocken	0.15	10 ^{7.5}	187	1 400.0
ND	0.85	10 ^{9.25}	258	2 057.0
Reo 1	0.3	10 ^{6.25}	400	1 910.0

4. Besprechung der Ergebnisse

Die in der Arbeit untersuchten 4 Virusarten ließen sich durch Gammastrahlen ab einem bestimmten Dosisbereich zuverlässig inaktivieren. Interessant war dabei, daß die Inaktivierungskinetik bei den vier strukturmäßig doch sehr unterschiedlichen Virusarten einheitlich ablief. Die Inaktivierungskurven erwiesen sich als signifikante Regressionsgeraden ($p < 0.001$). Damit entspricht die Inaktivierungskinetik einer Reaktion I. Ordnung. In der Literatur werden über die Inaktivierungskinetik von Viren mittels Gammastrahlen unterschiedliche Angaben gemacht. Die Mehrheit beschreibt den Inaktivierungsvorgang als "single-hit"-Prozeß. Unsere Ergebnisse bestätigen dies. Bei den Pockenviren wird auch eine 2-Komponenten-Inaktivierungskurve diskutiert. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, daß auch die Pockenviren, falls es erlaubt ist, aus den Ergebnissen mit den Hühnerpocken-Viren auf die anderen Pockenviren zu schließen, durch Gammastrahlen nach einer Reaktion I. Ordnung inaktiviert wurden.

Während der Bestrahlung erwärmte sich ein Teil der Proben bis zu einer Temperatur von 41°C . In den erwärmten Proben verlief die Inaktivierung ebenfalls nach einer Reaktion I. Ordnung. Dieser Befund weist darauf hin, daß die Inaktivierungskurve bis zu dieser Temperatur anscheinend temperaturunabhängig verläuft. Nach Di Gioia et al. (21) und Dilovski (22) soll in diesem Temperaturbereich die Inaktivierung einer 2-Komponentenkinetik entsprechen.

Die für eine vollständige Inaktivierung der 4 untersuchten Virusarten notwendigen Strahlendosen differierten sehr. Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Viren läßt sich am besten mittels der D_{10} -Werte aufzeigen. Das Pseudowut-Virus erwies sich gegenüber den Gammastrahlen am labilsten. Es folgten das Hühnerpocken- und ND-Virus und schließlich das Reo-Virus. Bei den ersten drei Viren handelt es sich um sog. behüllte Viren, das Reo-Virus ist unbehüllt. Pseudowut- und Hühnerpocken-Virus besitzen eine doppelsträngige DNS, das ND-Virus verfügt über eine einsträngige RNS, während das genetische Material des Reo-Virus aus einer doppelsträngigen RNS besteht. Nach Literaturangaben sollen Viren mit einsträngiger NS strahlenempfindlicher sein als solche mit einer doppelsträngigen NS (19, 35, 61, 62). Diese Annahme kann nicht bestätigt werden. Die beiden doppelsträngigen DNS-Viren (Pseudowut- und Hühnerpocken-Virus) erwiesen sich als wesentlich labiler als das mit einsträngiger RNS. Nach unseren Erfahrungen besteht in bezug auf Strahleninaktivierung eher eine Parallelität zur allgemeinen Tenazität von Viren gegenüber chemisch-physikalischen Einflüssen, wie Wärme, Oxydation, Desinfektionsmitteln u. a. (65, 66).

Die zur Inaktivierung notwendigen Strahlendosen entsprachen nur teilweise den Literaturangaben, sofern sich diese überhaupt auswerten ließen. Beim Pockenvirus sind Vergleiche mit der Literatur nicht möglich. Einmal, weil sich die Werte auf das Vaccinia-Virus beziehen und zum anderen, weil bei P a l a c i o s et al. (71) und auch bei F r i e s e n, S a n k o f f und S i m i n o v i t c h (33) Tempera-

turangaben fehlen, so daß nicht zu erkennen ist, ob sich die Werte auf flüssiges oder tiefgefrorenes Virusmaterial beziehen.

Die in den eigenen Versuchen ermittelten Dosen zur Inaktivierung des Pseudowut-Virus stimmen mit den Angaben von F r e s c u r a (30) und D i l o v s k i (22) weitgehend überein. Allerdings bestrahlte D i l o v s k i seine Virussuspensionen ohne Zusatz von Phenolrot und fötalem Rinderserum.

Für das ND-Virus liegen zwei sehr unterschiedliche D_{10} -Werte vor: Nämlich der D_{10} -Wert von D i g i o i a et al. (21) von etwa 170 krad und der von S u l l i v a n et al. (91) von 520 krad. Der eigene D_{10} -Wert beträgt ca. 258 krad. Obwohl Stammesdifferenzen bei diesem Virus sicher zu diskutieren sind, erscheinen die von S u l l i v a n et al. erzielten Ergebnisse bei ihrer Versuchsanordnung (vergl. 2.4.3) doch sehr hoch. Der in der Literatur beschriebene D_{10} -Wert für das Reo-Virus liegt nur wenig über dem in diesen Versuchen erhaltenen Wert.

Der Inaktivierungsvorgang mittels Gammastrahlen wird durch eine Reihe unterschiedlicher Parameter beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell "Pseudowut-Virus" der Einfluß einiger dieser Faktoren untersucht.

Ein wichtiger Faktor ist zunächst der Zustand, in dem das Virus während der Bestrahlung vorliegt. Lyophilisiertes Pseudowut-Virus benötigte zur vollständigen Inaktivierung eine drei-

mal höhere Strahlendosis als Virus in Suspension. Der Grund hierfür dürfte in den verschiedenartigen Wirkungsmechanismen der Strahlen zu suchen sein. Lyophilisate sollen hauptsächlich der "direkten" Strahlenwirkung ausgesetzt sein, während in Suspensionen die Strahlen sowohl "direkt" als auch "indirekt" auf die Viren einwirken.

Der Proteingehalt scheint ab einer bestimmten Konzentration keinen signifikanten Einfluß auf die Inaktivierung zu haben. Da sich die verschiedenen Viruspräparate in ihrem Proteingehalt unterschieden, wurde ein Bestrahlungsversuch mit einer Virussuspension, der die doppelte Menge an fötalem Rinderse-
rum zugesetzt wurde, durchgeführt. Proteine wirken als "Radikalfänger" (15, 57, 63). Es lag daher die Vermutung nahe, daß bei einem erhöhten Proteinzusatz eine höhere Dosis für die Inaktivierung benötigt wird. Unsere Versuche konnten das aber nicht bestätigen.

Die Hauptanwendungsbereiche einer Gammabestrahlung bei Viren betreffen einmal die Desinfektion bzw. Sterilisation und zum anderen die Inaktivierung bzw. Herstellung biologischer Präparate, wie z. B. Impfstoffe oder Inducer. Für eine Sterilisation von Lebensmitteln oder Klärschlamm etc. können die für eine vollständige Inaktivierung ermittelten Strahlendosen bedenkenlos überschritten werden. Hierdurch ergibt sich sogar ein weiterer Sicherheitsfaktor. Bei der Anwendung von Strahlen zur Inaktivierung unter Erhalt bestimmter biologischer Eigenschaften, wie z. B. Antigenität, Immunogenität, Hämagglutination usw., muß jedoch sehr darauf geachtet werden, daß

die für eine vollständige Inaktivierung notwendige Strahlendosis nicht überschritten wird. Von den für den Aufbau eines Virus essentiellen Strukturen ist das Virusgenom, d.h. die Virus-Nukleinsäure, am stärksten strahlenempfindlich. Ihre Inaktivierung führt zu einem Verlust der Vermehrungsfähigkeit eines Virus. Bei einer Strahlendosis, die diesen Vorgang auslöst, sind die biologischen Aktivitäten der anderen Virusstrukturen noch voll erhalten. So blieb die hämagglutinierende Aktivität des Newcastle Disease-Virus nach einer Bestrahlung mit 2057.0 krad, die zu einem Verlust der Vermehrungsfähigkeit des Virus führte, noch voll erhalten. Mit 1061.5 krad bestrahltes Pseudowut-Virus besaß noch volle immunisierende Wirksamkeit, was sich durch eine Bildung spezifischer Antikörper und dem protektiven Schutz gegenüber einer Challengedosis nachweisen ließ. Mit 1400.0 krad bestrahltes Hühnerpocken-Virus verlor nach der Inaktivierung nicht seine paramunisierende Potenz, die sich durch Lymphozytenstimulierung, Interferonbildung, Infektionsschutz und Phagozytoseerhöhung äußert (noch nicht veröffentlichte Versuchsergebnisse). Wird aber die Strahlendosis über das für die Inaktivierung notwendige Maß hinaus stark erhöht, so muß auch mit der Zerstörung dieser biologischen Aktivitäten gerechnet werden (siehe 2.3.5).

5. Zusammenfassung

Die Kinetik der Inaktivierung von hochtitrigen Viruspräparationen (Suspensionen, Lyophilisate) durch Gammastrahlen wurde an Hühnerpocken-, Pseudowut-, Newcastle Disease- und Reo-Viren untersucht.

Die Viruspräparate ließen sich mittels Gammastrahlen vollständig inaktivieren. Restvirus konnte durch eine Erhöhung der Strahlendosis eliminiert werden.

Die Inaktivierung verlief bei allen vier Virusarten als Reaktion I. Ordnung.

Für das in Suspension gehaltene Virus wurden folgende D_{10} -Werte ermittelt: Pseudowut-Virus 147 krad; Hühnerpocken-Virus 187 krad; ND-Virus 258 krad; Reo-Virus 400 krad. Für das lyophilisiert bestrahlte Pseudowut-Virus konnte ein D_{10} -Wert von 467 krad ermittelt werden. Die Lyophilisate benötigten also eine dreimal höhere Strahlendosis als das flüssige Virusmaterial.

Eine Erhöhung des Proteinanteils hatte keinen signifikanten Einfluß auf die für eine Inaktivierung notwendige Strahlendosis.

Beim Newcastle Disease-Virus blieben die hämagglutinierenden Komponenten nach Verlust der Vermehrungsfähigkeit (2057.0 krad) noch voll erhalten.

Summary

Comparative studies on the inactivation of various virus species by gamma-irradiation

The kinetics of the inactivation of virus preparations with high titres (suspensions, lyophilisates) by gamma-irradiation were investigated on Fowlpox-, Pseudorabies-, Newcastle disease-, and Reo-viruses.

The virus preparations were totally inactivated by gamma-irradiation. Residual virus could be eliminated by increasing the irradiation dose. The inactivation of all 4 virus species followed first-order kinetics.

For the virus suspensions the following D_{10} -values were established: Pseudorabies virus 147 krad; Fowlpox virus 187 krad; Newcastle disease virus 258 krad; Reo virus 400 krad. For the lyophilized Pseudorabies virus a D_{10} -value of 467 krad was found. Thus for the lyophilisates a three times stronger irradiation dose was necessary than for the suspensions.

An increase of the protein content had no significant influence on the irradiation dose necessary for inactivation.

On Newcastle disease virus the hemagglutinating components were still present after loss of reproductiveness.

6. Literaturverzeichnis

- 1 ALEXANDER, P. and LETT, J.T.
Role of oxygen in the cross-linking and degradation
of deoxyribonucleic acid by ionizing radiations
Nature 187: 933 (1960)
- 2 ALLSOPP, C.B.
Introductory survey of experimental data
aus Brit. J. Radiol., 1, "Certain aspects of the
action of radiations on living cells": 43 (1947)
- 3 BASILICO, C. and DIMAYORCA, G.
Radiation target size of the lytic and the trans-
forming ability of the polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54: 125 (1965)
- 4 BENJAMIN, T.L.
Relative target sizes for the inactivation of the
transforming and reproductive abilities of polyoma
virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54: 121 (1965)
- 5 BENYESH, M., POLLARD, E.C., OPTON, E.M., BLACK, F.L.,
BELLAMY, W.D., and MELNICK, J.L.
Size and structure of ECHO, poliomyelitis and measles
virus determined by ionizing radiations and ultrafil-
tration
Virology 5: 256 (1958)
- 6 BLEICHRODT, J.F., VERHEIJ, W.S.D., and DE JONG, J.
Involvement of the excision repair system in recovery
of bacteriophage from γ -ray damage sustained under oxic
and anoxic conditions
Int. J. Radiat. Biol. 22: 325 (1972)

- 7 BLOK, J. and LOMAN, H.
The effects of γ -radiation in DNA
Current Topics in Radiation Research 9: 165 (1973)
- 8 BLOK, J. and VERHEY, W.S.D.
The attack of free radicals on biologically active
DNA irradiated in aqueous solutions
Rad. Res. 34: 689 (1968)
- 9 BOHNE, L., COQUERELLE, Th., and HAGEN, U.
Radiation sensitivity of bacteriophage DNA. II. Breaks
and cross-links after irradiation in vivo
Int. J. Radiat. Biol. 17: 205 (1970)
- 10 BOLING, M.E. and RANDOLPH, M.L.
Effects of X-irradiation on a temperate bacteriophage
of Haemophilus influenzae
Journal of Virology 22: 47 (1977)
- 11 BOYE, E., JOHANSEN, D., and BRUSTAD, T.
The yield of radiation-induced DNA single strand breaks
in Escherichia coli and superinfecting phage λ at dif-
ferent dose rates. Repair of strand breaks in different
buffers
Rad. Res. 68: 499 (1976)
- 12 BOYLE, J.M. and SYMONDS, N.
Radiation-sensitive mutants of T₄D.I.T₄y: a new radiation-
sensitive mutant; effect of the mutation on radiation sur-
vival, growth and recombination
Mutat. Res. 8: 431 (1969)
- 13 BUZELL, A., BRANDON, F.B., and LAUFFER, M.
Effects of X-radiation on influenza virus
Arch. Biochem. Biophys. 58: 318 (1955)

- 14 DAINTON, F.S.
On the existence of free atoms and radicals in
water and aqueous solutions subjected to ionizing
radiation
J. Phys. Chem. 22: 490 (1948)
- 15 DALE, W.M.
The indirect action of ionizing radiations on aqueous
solutions and its dependence on the chemical structure
of the substrate
J. Cellular Comp. Physiol. 39: 39 (1952)
- 16 DANEŠ, L., HRUŠKOVA, J., BLÁŽEK, K.
Poxvirus officinale inactivated by gamma radiation.
Immunogenicity of the antigen
J. Hyg., Epid., Microbiol., Immunol. 10: 210 (1966)
- 17 DECKER, C., GUIR, J., and KIRN, A.
Infectivity and capacity for DNA replication of vac-
cinia virus irradiated by γ -rays
J. Gen. Virology 4: 221 (1969)
- 18 DEFENDI, V., JENSEN, F., and SAUER, G.
The molecular biology of viruses
Academic Press, New York: 645 (1967)
- 19 DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)
- 20 DIEHL, J.F.
Sterilisation von Lebensmitteln durch Strahlen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 156: 157 (1972)

- 21 DIGIOIA, G.A., LICCIARDELLO, J.J., NICKERSON, J.T.R.,
and GOLDBLITH, S.A.
Effect of temperature on radiosensitivity of Newcastle
disease virus
Appl. Microbiol. 19: 455 (1970)
- 22 DILOVSKI, M.
Der Einfluß von ionisierenden Strahlen auf Tierviren
I. ϕ -Inaktivierung des Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B. 19: 128 (1972)
- 23 ENGLANDER, S.N., BUZELL, A., and LAUFFER, M.A.
Unveröffentlichte Ergebnisse
- 24 EPSTEIN, H.T.
Identification of radiosensitive volume with nucleic
acid volume
Nature 171: 394 (1953)
- 25 FLUKE, D.J.
Radiation sensitivity of T1 bacteriophage on various
host strain mutants of Escherichia coli
Rad. Res. 71: 406 (1977)
- 26 FREIFELDER, D.
Mechanism of inactivation of coliphage T7 by X-rays
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 128 (1965)
- 27 FREIFELDER, D.
DNA strand breakage by X-radiation
Rad. Res. 29: 329 (1966)
- 28 FREIFELDER, D.
Physicochemical studies on X-ray inactivation of bac-
teriophage
Virology 36: 613 (1968)

- 29 FREIFELDER, D. and DAVISON, P.F.
Letters to the editor
Biophys. J. 3: 97 (1963)
- 30 FRESCURA, T.
Inattivazione del virus di Ajjeszky con le radiazioni
gamma in diverse condizioni sperimentali
Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 22: 839 (1968)
- 31 FRESCURA, T., MASSA, D., CARDARAS, P.
Effetti delle radiazioni gamma sul potere infettante,
antigenico ed immunogeno del virus aftoso
Estratto dal "Boll. Ist. Sieroter. Mil" 51: 109 (1972)
- 32 FRESCURA, T. and VIVOLI, P.
Studies of the foot-and-mouth disease virus sub-types
using antigens inactivated by gamma radiations
Zb. Vet. Med. B. 20: 822 (1973)
- 33 FRIESEN, J.D., SANKOFF, D., and SIMINOVITCH, L.
Radiobiological studies of vaccinia virus
Virology 21: 411 (1963)
- 34 GINOZA, W.
Radiosensitive molecular weight of single stranded
virus nucleic acids
Nature 199: 453 (1963)
- 35 GINOZA, W.
The effects of ionizing radiation on nucleic acids
of bacteriophages and bacterial cells
Ann. Rev. Microbiol. 21: 325 (1967)
- 36 GINOZA, W.
Inactivation of viruses by ionizing radiation and by
heat. In K. Maramorosch and H. Koprowski (ed.)
"Methods in virology" vol. 4 Academic Press Inc. N.Y. (1968)

- 37 GREEN, A.B.
On the action of radium on microorganisms
Proc. R. Soc. B. 73: 375 (1904)
- 38 GRUBER, J.
Purification, concentration, and inactivation of
Venezuelan equine encephalitis virus
Appl. Microbiol. 20: 427 (1970)
- 39 GUILD, W.R.
The radiation sensitivity of deoxyribonucleic acid
Rad. Res. 3: 257 (1963)
- 40 HAWKINS, R.B.
The measurement of ionizing radiation- induced cross
linkage of DNA and protein in bacteriophage
Rad. Res. 68: 300 (1976)
- 41 HAYNES, R.H.
Role of DNA repair mechanisms in microbial inacti-
vation and recovery phenomena
Photochem. Photobiol. 3: 429 (1964)
- 42 HIATT, C.W.
Kinetics of the inactivation of viruses
Bact. Reviews 18: 150 (1964)
- 43 HRUŠKOVA, J.
Effects of gamma radiation on the Western equine
encephalomyelitis and tick-borne encephalitis viruses
Acta Virologica 13: 187 (1969)
- 44 JIMÉNEZ, R. and OHLBAUM, A.
Inactivation of vaccinia virus by γ -radiation
Z. Naturf. 21: 52 (1966)

- 45 JOHNSON, C.D.
Direct X-ray inactivation of the viruses of
Teschén and Talfán diseases, foot-and-mouth
disease and vesicular stomatitis
Nature 207: 37 (1965)
- 46 JORDAN, R.T. and KEMPE, L.L.
Inactivation of some animal viruses with γ -ra-
diation from Cobalt-60
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91: 212 (1956)
- 47 JUNG, H., HAGEN, U., ULLRICH, M., and PETERSEN, E.E.
Structural and functional changes in DNA after expo-
sure to hydrogen atoms and gamma radiation
IAEA-SM-145/20 Vienna (1971)
- 48 KÁRBER, G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer
Reihenversuche
Arch. exp. Path. Pharmac. 162: 480 (1931)
- 49 KANAZIR, D.T.
Radiation induced alterations in DNA
Progr. Nucl. Acid. Res. 9: 117 (1969)
- 50 KAPLAN, C.
The antigenicity of γ -irradiated vaccinia virus
J. Hyg., Camb. 58: 391 (1960)
- 51 KAPLAN, H.S. and MOSES, L.E.
Biological complexity and radiosensitivity
Science 145: 21 (1964)
- 52 KIMBALL, R.F.
Nongenetic effects of radiation on microorganisms
Ann. Rev. Microbiol. 11: 199 (1957)

- 53 LATARJET, R.
Interaction of radiation energy with nucleic acids
Current Topics of Radiation Research 8: 1 (1972)
- 54 LATARJET, R., CRAMER, R., and MONTAGNIER, L.
Inactivation by UV, X, and gamma radiation of the
infecting and transforming capacities of polyoma
virus
Virology 33: 104 (1967)
- 55 LATARJET, R., EKERT, B., and DEMERSEMAN, P.
Peroxidation of nucleic acids by radiation:
biological implications
Rad. Res. 3: 247 (1963)
- 56 LAUFFER, M.
Inactivation of viruses
Proc. of the 4th Intern. Congress of Biochemistry
Wien 1958
Pergamon Press: 167 (1959)
- 57 LEA, D.E.
Action of radiations on living cells
Cambridge Univ. Press. N.Y. (1947)
- 58 LEA, D.E. and SALAMAN, M.H.
The inactivation of vaccinia virus by radiations
Brit. J. Exp. Pathol. 23: 27 (1942)
- 59 LEA, D.E., SMITH, K.M., HOLMES, B., and MARKHAM, R.
Direct and indirect actions of radiations on viruses
and enzymes
Parasitology 36: 110 (1944)
- 60 LEENHOUTS, H.P. and CHADWICK, K.H.
Radiation induced DNA double strand breaks and chromo-
some aberrations
Theoretical and applied Genetics 44: 167 (1974)

- 61 LEVINSON, W. and RUBIN, H.
Radiation studies of avian tumor and of Newcastle
disease virus
Virology 28: 533 (1966)
- 62 LOGAN, D.M. and WHITMORE, G.F.
Radiation effects on polyoma virus
Virology 25: 495 (1964)
- 63 LURIA, S.E. and EXNER, F.M.
The inactivation of bacteriophages by X-rays.
Influence of the medium
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 27: 370 (1941)
- 64 MADIN, S.H., ANDRIESE, P.C., and DARBY, N.B.
The in vitro cultivation of tissues of domestic
and laboratory animals
Am. J. vet. Res. 18: 932 (1957)
- 65 MAHNEL, H.
Untersuchungen zur Virusinaktivierung in Trink- und
Oberflächenwasser
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 165: 527 (1977)
- 66 MAHNEL, H., OTTIS, K., HERLYN, M.
Stabilität von neun Virusarten unterschiedlicher
Genera in Trink- und Oberflächenwasser
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 164: 68 (1977)
- 67 MAYR, A. und KALCHER, K.
Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügel-
pocken in der Zellkultur
Arch. ges. Virusforsch. 10: 72 (1960)
- 68 MCCREA, J.F.
Ionizing radiation and its effects on animal viruses
Ann. N.Y. Acad. Sci. 83: 692 (1960)

- 69 MINSKY, B.D. and Brown, A.
X-ray-mediated crosslinking of protein and DNA
Rad. Res. 71: 505 (1977)
- 70 NEYMAN, J. and PURI, P.S.
A structural model of radiation effects in living
cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3360 (1976)
- 71 PALACIOS, R., CONTRERAS, G., ESPEJO, R., JIMÉNEZ, R.,
OHLBAUM, A., and TOHÁ, T.
Compound survival curve of vaccinia virus after gamma
radiation
Biochem. Biophys. Acta 68: 149 (1963)
- 72 PEACOCKE, A.R. and PRESTON, B.N.
The action of γ -rays on sodium deoxyribonuclease in
solution.
II. Degradation
Proc. Roy. Soc. B. 153: 90 (1960)
- 73 PFAU, C.J. and MCCREA, J.F.
Release of deoxyribonucleic acid from vaccinia virus
by 2-mercaptoethanol and pronase
Nature 194: 894 (1962)
- 74 POLLEY, J.R.
Preparation of non infective soluble antigens with
gamma radiation
Canad. J. Microbiol. 7: 135 (1961)
- 75 POLLEY, J.R.
Factors influencing inactivation of infectivity and
hemagglutinin of influenza virus by gamma radiation
Canad. J. Microbiol. 7: 535 (1961)

- 76 POLLEY, J.R.
The use of γ -radiation for the preparation of
virus vaccines
Canad. J. Microbiol. 8: 455 (1962)
- 77 POLLEY, J.R. and GUERIN, M.M.
Preparation of a stable non infective Western
equine encephalomyelitis virus antigen from
allantoic fluid
Canad. J. Microbiol. 14: 1017 (1968)
- 78 RAJEWSKY, B.
Strahlendosis und Strahlenwirkung
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1956)
- 79 RANDOLPH, M.L. and SETLOW, K.J.
Mechanism of inactivation of transforming deoxyri-
bonucleic acid by X-rays
J. Bact. 106: 221 (1971)
- 80 REITMAN, M.
Non viable Venezuelan equine encephalomyelitis
hemagglutinin prepared from tissue cultures by
gamma radiation
Appl. Microbiol. 18: 278 (1969)
- 81 REITMAN, M. and TRIBBLE Jr., H.R.
Inactivation of Venezuelan equine encephalomye-
litis virus by γ -radiation
Appl. Microbiol. 15: 1456 (1967)
- 82 REITMAN, M., TRIBBLE Jr., H.R., and GREEN, L.
Gamma-irradiated Venezuelan equine encephalitis
vaccines
Appl. Microbiol. 19: 763 (1970)

- 83 RICHTER, H.
Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung ionisierender
Strahlung bei der Herstellung von Impfstoffen
Monatshefte für Veterinärmedizin 16: 619 (1973)
- 84 ROLLE, M. und MAYR, A.
Mikrobiologie und Seuchenlehre
4. Auflage
F. Enke Verlag, Stuttgart (1978)
- 85 VAN DER SCHANS, G.P., BLEICHRODT, J.F., BLOK, J.
Contribution of various types of damage to inactivation
of a biologically-active double stranded circular DNA
by gamma radiation
Int. J. Radiat. Biol. 23: 133 (1973)
- 86 SCHOLES, G.
Primary events in the radiolysis of nucleic acids and
their components
Israel Journal of Chemistry 10: 1107 (1972)
- 87 SCHOLES, G., WARD, J.F., and WEISS, J.
Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic
acids
J. Mol. Biol. 2: 379 (1960)
- 88 SETLOW, R.B. and SETLOW, J.K.
Effects of radiation on polynucleotides
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1: 293 (1972)
- 89 SMITH, K.C.
Dose dependent decrease in extrability of DNA from bacteria
following irradiation with ultraviolet light or visible light
plus dye
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8: 157 (1962)

- 90 SPEARMAN, C.
zitiert nach KÄRBER, G., Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche
Arch. exp. Path. Pharmac. 162: 480 (1931)
- 91 SULLIVAN, R., FASSOLITIS, A.C., LARKIN, E.P., READ Jr., R.B., and PEELER, J.T.
Inactivation of thirty viruses by gamma radiation
Appl. Microbiol. 22: 61 (1971)
- 92 TERZI, M.
Comparative analysis of inactivating efficiency of radiation on different organisms
Nature 191: 461 (1961)
- 93 TITOLI, F., GIALETTI, L., BEGLIOMINI, A.
Inattivazione del virus della peste suina classica a mezzo di radiazioni gamma
Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 12: 960 (1969)
- 94 TRAUB, F.B., FRIEDEMANN, U., BRASCH, A., and HUBER, W.
High intensity electrons as a tool for preparation of vaccines.
I. Preparation of rabies vaccine
J. Immunol. 67: 379 (1951)
- 95 TUMANJAN, M.A. und PERŠINA, Z.G.
Wirkung ionisierender Strahlen auf Mikroorganismen und die Strahlensterilisation
aus Žurnal Microbiologii 5: 75 (1971)
- 96 WACKER, A.
Molecular mechanisms of radiation effects
Progr. Nucl. Acid. Res. 1: 369 (1963)

- 97 WARD, J.F. and KUO, J.
Strand breaks, base release and postirradiation
changes in DNA gamma-irradiated in dilute O_2 -
saturated aqueous solution
Rad. Res. 66: 485 (1976)
- 98 WEINERT, H. und HAGEN, U.
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribo-
nukleinsäure im Chromatin
Strahlentherapie 136: 204 (1968)
- 99 WEISS, J.
Radiochemistry of aqueous solutions
Nature 153: 748 (1944)
- 100 WEISS, J.
Chemical effects of ionizing radiations on nucleic
acids and related compounds
Progr. Nucl. Acid. Res. 3: 103 (1964)
- 101 WIKTOR, T.J., AASLESTAD, H.G., and KAPLAN, M.M.
Immunogenicity of rabies virus inactivated by β -
propiolactone, acetyleneimine, and ionizing
irradiation
Appl. Microbiol. 23: 914 (1972)
- 102 WILSON, D.E.
Radiation inactivation of vaccinia virus
Rad. Res. 14: 796 (1961)
- 103 ZIMMER, K.G., HOTZ, G., HERMANN, K.O., JUNG, H.,
KÜRZINGER, K., MÜLLER, A., WENZELMANN, J., DERTINGER,
H., HAGEN, U., BOHNE, L., COQUERELLE, Th., and BERGER,
K.U.
Some recent studies in molecular radiobiology
Current Topics in Radiation Research 5: 1 (1969)

Lebenslauf

Am 15. Februar 1952 wurde ich, Heidi Stettmund von Brodorotti, als einzige Tochter des Rundfunktechnikers Leonhard Stettmund von Brodorotti und seiner Ehefrau, der Tierärztin Dr. Maria Stettmund von Brodorotti, geb. Gräfin von Ledebur-Wicheln, in München geboren.

Von 1958-1962 besuchte ich die Volksschule in München; von dort wechselte ich auf das Gymnasium der Armen Schulschwestern v. U. L. Fr. am Anger über und schloß 1971 mit dem Abitur ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich in München mit dem Studium der Veterinärmedizin und legte am 27.01.1977 das Staatsexamen ab.

Die Approbation als Tierärztin erhielt ich am 01.03.1977.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich im April 1977 begonnen.

Seit dem 01.05.1977 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Fachbereich Tiermedizin, angestellt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für seine Hilfe danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Mahnel für die jederzeit gern gewährte Unterstützung und für wertvolle Hinweise.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. K. Osterkorn für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

